Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. F. Heni

Über eine Methode zur papierchromatographischen Trennung und quantitativ-kolorimetrischen Bestimmung der Cortine und Corticoide im Urin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Roswitha Bizenberger
aus Erlenbach

1964

7781

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0085

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. F. Heni

Über eine Methode zur papierchromatographischen Trennung und quantitativ-kolorimetrischen Bestimmung der Cortine und Corticoide im Urin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Roswitha Bizenberger
aus Erlenbach

1964

Dekan: Professor Dr. H. HARMS
Berichterstatter: Professor Dr. F. HENI

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. METHODIK	7
1. Hydrolyse und Extraktion	7
2. Vorreinigung	7
3. Gruppenbestimmung der C_{21}-Steroide	8
4. Papierchromatographische Trennung der Harnextrakte	9
5. Anfärbung der Chromatogramme	9
6. Identifizierung der Banden	10
7. Quantitative Bestimmung der individuellen C_{21}-Steroide	10
C. ERGEBNISSE	13
1. Ergebnisse bei der Vorreinigung mit verschiedenen Modifikationen der Girardtrennung	13
2. Beschreibung der Chromatogramme und der Extinktionsdiagramme	16
3. Individuelle C_{21}-Steroide innersekretorisch Gesunder und Veränderung der Ausscheidung nach Gabe von Dexamethason	18
4. C_{21}-Steroidausscheidung nach peroraler Verabreichung von Cortisol, 11-Desoxycortisol und Aldosteron	23
D. DISKUSSION	26
E. ZUSAMMENFASSUNG	30
F. LITERATUR	31
Lebenslauf	

A. EINLEITUNG

Da die Bestimmung der Corticoide im Urin heutzutage einen wesentlichen Bestandteil der endokrinologischen Diagnostik darstellt, wurde zu ihrem Nachweis bereits eine Vielzahl von Verfahren entwickelt. Das erste, das sich für eine quantitative Bestimmung der im Urin ausgeschiedenen Hormone bzw. Metaboliten der von der Nebenniere und den Testes sezernierten Wirkstoffen eignete, war die Gruppenreaktion der 17-Ketosteroide, eine von Zimmermann (1935, 88) erstmalig beschriebene Farbreaktion. Wegen der Einfachheit der Methode fand diese kolorimetrische Gruppenbestimmung im klinischen Routinegebrauch eine erhebliche Verbreitung. Allerdings gewinnt man hierdurch in der Hauptsache lediglich einen Überblick über die Androgenproduktion, da die 17-Ketosteroide großenteils Metaboliten der aus Testes und Nebennieren stammenden Androgene darstellen, während die Gluco- und Halocortine bzw. ihre Umbauprodukte, die bei der Untersuchung der Nebennierenfunktion von besonderer Bedeutung sind, in der Minderzahl vorliegen.

Man hat daher bei der Prüfung der Nebennierenfunktion in den letzten Jahren anderen Methoden bei der Bestimmung der Corticoide den Vorzug gegeben, die ebenfalls bei verschiedenen Reaktionsansätzen eine Bildung charakteristischer Farbstoffe bei gemeinsamen chemischen Eigenschaften ermöglichen, die aber im Gegensatz zu den vorher genannten Verfahren vornehmlich einen Überblick über die Ausscheidung von Gluco- bzw. Halocortinen und ihren Derivaten geben.

Dabei haben sich besonders die Bildung von Phenylhydrazon durch 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide in Phenylhydrazin-Schwefelsäure, allgemein als Porter-Silber-Reaktion (1950, 58) bekannt (modifiziert von Baggett et al. (1952, 2), Sandberg (1953, 66), Reddy (1954, 59), Vestergaard (1953, 84), Rivoire et al. (1955, 62)) und ein Reduktionsverfahren zum Nachweis von 21-Hydroxy-20-Ketosteroiden sowie 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden, z.B. mit Blautetrazol (Mader u. Buck 1952, 45) bewährt, während die Bestimmungen der formaldehydabspaltenden Steroide (Löwenstein et al. 1946, 41) und der 17-ketogenen Steroide (Norymberski et al. 1953, 52) Fehlerquellen aufweisen, die von Patterson u. Marrian (1953, 54) und von Freislederer et al. (1959, 17) im einzelnen festgestellt wurden. Allerdings vermittelt die Gruppenbestimmung der Corticoide im Urin nur einen relativ groben Überblick über die Nebennierenrindensekretion an Cortisol, da ja hierbei die Ausscheidung von Cortisol, Cortison, 11-Desoxycortisol (Cp. S), Cortexon und 11-Dehydrocoticosteron nebst Metabo-

liten en bloc erfaßt wird. Für differenziertere Untersuchungen, insbesondere als Vorbereitung für die Berechnung der entsprechenden Sekretionsraten, erschien ein Verfahren, das eine getrennte Bestimmung der Metaboliten der einzelnen Nebennierenhormone erlaubt, wünschenswert.

Ein solches Verfahren lag bereits für die Gruppe der C_{19}-Harnsteroide vor (20). Hiermit konnten bei verschiedenen Krankheitsbildern charakteristische Veränderungen der individuellen 17-Ketosteroide festgestellt werden. Beim konstitutionellen Hirsutismus ließ sich die hier bereits schon längere Zeit bekannte Vermehrung der Dehydroepiandrosteronfraktion (21, 27) nachweisen, beim angeborenen adrenogenitalen Syndrom eine vermehrte Ausscheidung von 11-Hydroxyandrosteron und 11-Ketoätiocholanolon, beim Morbus Cushing als Charakteristikum eine vermehrte Ausscheidung von 11-Hydroxy- und 11-Ketoätiocholanolon (28).

Auf Grund dieses Verfahrens, das genaue Werte für die Dehydroepiandrosteronausscheidung und die einzelnen 11-oxylierten 17-Ketosteroide liefert, war eine Berechnung der Sekretionsraten von Dehydroepiandrosteron, Adrenosteron bzw. 11-Hydroxyandrostendion und Cortisol möglich. Die quantitativ-kolorimetrische Bestimmung der 17-Ketosteroide eignete sich jedoch nur für die Berechnung der Nebennierenrinden-Hormonproduktionsraten von C_{19}- und von C_{21}-Steroiden, sofern letztere ein 17-Hydroxyl tragen, denn allein diese werden zu 17-Ketosteroiden abgebaut, während die anderen in der Nebennierenrinde sezernierten C_{21}-Steroide ohne Hydroxyl am C-Atom 17, wie z.B. Corticosteron, 11-Dehydrocorticosteron (Kendalls Cp.A), Desoxycorticosteron und Aldosteron nicht zu 17-Ketosteroiden abgebaut werden können und damit auch dem Nachweis entgehen. Die Bestimmung der Nebennierenrindensekretionsraten der zuletzt genannten Steroide ist für Untersuchungen von Störungen des Salz-Wasserhaushaltes von entscheidender Bedeutung und die exakte Erfassung der Metaboliten im Urin ist als Berechnungsgrundlage hierfür unbedingt erforderlich (24, 39, 65).

Von den bisherigen Untersuchern gingen Neher u. Wettstein (1955, 50), Johnson u. Heftman (1956, 34) und Wilson et al. (1958, 85) von einer 24-Stundensammelmenge aus. Dyrenfurth et al. (1958, 13) verwandten als Ansatz eine 12-Stundenurinmenge, Frantz et al. (1961, 16) 10 % der Ausgangsmenge. Marks et al. (1957, 46), Gold et al. (1958, 23) sowie Romani (1955, 63) gaben einem kleineren Ansatz von 30 bis 50 ml den Vorzug.

Für die Freisetzung der Steroide aus ihren Bindungen an Schwefelsäure und Glucuronsäure wurde seit Zaffaroni (1950, 87) nahezu ausschließlich eine Hydrolyse bei pH 1 mit Salzsäure oder Schwefelsäure alleine empfohlen (s. a. Vennig (1953, 82), Wilson et al. (pH 0,8) und Teller u. Staib (79, pH 0,5)). Hierbei wird nur der kleinere, an Schwefelsäure gebundene Teil der

Corticoide aus seiner Verbindung gelöst, der größere Teil, der an Glucuronsäure gebunden vorliegt, bedarf neben der pH 1-Hydrolyse eine solche mit β-Glucuronidase, wie wir sie nach unseren Erfahrungen bei der Urinhydrolyse vor der Bestimmung der 17-Ketosteroide schon früher durchführten. In letzter Zeit, in der man bei der Corticoidbestimmung ein größeres Gewicht auf die Erfassung der Tetrahydroderivate der Cortine im Urin legt, hat auch die fermentative Hydrolyse für die Isolierung dieser fast ausschließlich Glucuronid-konjugierten Steroide an Bedeutung gewonnen. Die zu diesem Zweck angegebenen Fermentmengen betragen durchschnittlich 300 bis 500 Einheiten/ml Urin (Marks et al., 1957, 46; Dyrenfurth et al. 1958, 13; Wilson et al. 1958, 85; Ulstrom et al. 1960, 80), auch 1000 E/ml Urin werden zugegeben (Gold et al. 23). Die Acidität des Ansatzes entspricht einem pH von 4,5 (Frantz et al. u.a.), 5,0 (u.a. Marks et al. 46) bis 7,0 (Gray et al. 1956, 25). Romani und Johnson et al. führten zunächst eine fermentative und anschließend eine pH 1-Hydrolyse durch.

Die Extraktion der Hormone geschieht bei Zaffaroni et al., Wilson et al., Teller u. Staib (78) kontinuierlich mit Äther, letztere verwenden zusätzlich noch Äthylacetat. Romanoff et al. (1957, 64) nehmen nur Äthylacetat als Extraktionsmittel, Ulstrom et al. Äthylacetat und Methylenchlorid. Mit Chloroform extrahieren Vennig et al. (82), de Courcy u. Gray (10), Marks et al. (46) und Gold et al. (23).

Eine nachfolgende Reinigung der die Steroide enthaltenden Extrakte von störenden Pigmenten muß als unerläßliche Aufgabe angesehen werden.

Hierbei wurde früher bereits das Verfahren der Girardtrennung angewandt, zuerst von Reichstein (1936, 60) zur Darstellung von Steroiden aus Nebennierenrindenextrakten. Später wandten Pincus u. Pearlman (56) sowie Talbot et al. (77), Dobriner (12) das Verfahren bei der Vorreinigung der Harn-17-Keto-Fraktion an. Sprechler (1950, 74) arbeitete eine Modifikation der Girardmethode zur Trennung von Keto- und Nichtketosteroiden aus und erreichte damit auch gleichzeitig eine Reinigung. Die neutralen Corticoide löste er in Eisessig und Girard's Reagens-T, ließ sie über Nacht stehen, extrahierte die Nichtketofraktion mit Chloroform, die Ketofraktion nach zweistündiger Hydrolyse ebenfalls. Die Chloroformauszüge wurden mit Natronlauge und Aqua dest. gewaschen und die Corticoide quantitativ mit Phosphormolybdänsäure bestimmt. Sprechler findet dabei Werte zwischen 0,033 bis 1,33 mg/24 Std. bei innersekretorisch gesunden männlichen Untersuchten. Vestergaard (1953, 84) bediente sich ebenfalls dieses Verfahrens zur Vorreinigung.

Als weiterer Vorreinigungsschritt wird bei verschiedenen Verfahren eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen zwei Lösungsmitteln vorgenommen.

So führen Neher u. Wettstein (1955, 50) bei der von ihnen beschriebenen Aldosteronbestimmung eine Säuberung der Extrakte mittels Verteilungschromatographie an einer Silicagel-Säule durch. Die zu reinigende Substanz nehmen sie in Chloroform auf, bringen sie auf die Säule und eluieren mit Chloroform-Aceton (1:1). Hurlock u. Talalay (1958, 31) geben ihre in Methanol gelösten Extrakte, je nach Verschmutzungsgrad, ein- oder zweimal über eine Amberlit-Säule. Dextran-Gel zur Reinigung von Steroidextrakten wurde bisher lediglich von Beling (3) bei der Präparation von C_{18}-Steroiden verwandt. Die Vorreinigung von C_{21}-Steroiden wird hier mit Dextran-Gel erstmalig beschrieben.

Bei den bisher geübten Verfahren zur Auftrennung der Corticoide wurde einerseits die Säulenchromatographie, andererseits die Papierchromatographie verwandt. Hoffmann u. Staudinger (1951, 29) bedienten sich der säulenchromatographischen Fraktionierung. Die in Methanol aufgenommenen und dann von Zellulosepulver aufgesaugten Corticoidextrakte wurden auf eine mit Whatman-Zellulosepulver bepackte Säule gegeben. Eluiert wurde mit butanol- oder heptanolgesättigtem Wasser. Katzenellenbogen et al. (1953, 37) benutzten an Silicagel gebundenes Äthanol als stationäre Phase, Petroläther mit kleinen Chloroformmengen stellte die mobile Phase dar. Die Polarität der mobilen Phase konnte durch Zusatz von Petroläther vermindert werden. Für Steroide, die mit dieser Methode nicht auftrennbar waren, wurde Formamid als stationäre Phase und Cyclohexan oder Cyclohexan-Benzol als mobile Phase benutzt. Heftmann u. Johnson (1954, 26) führten eine Verteilungschromatographie auf Silicagel durch, wobei Wasser die stationäre Phase und Petroläther, versetzt mit ansteigenden Mengen Dichlormethan, die mobile Phase bildete. Wilson et al. (85) verwandten eine Säule aus 13 % Aluminium und 87 % Kieselgel, die Entwicklung erfolgte mit Hexan, welches in ansteigender Konzentration Chloroform enthielt. Sie eluierten als zwei Fraktionen $C_{19}O_2$ und $C_{21}O_2$ sowie $C_{19}O_3$, $C_{21}O_3$-Corticoide, schließlich als 3. Fraktion alle übrigen Corticosteroide.

Zaffaroni et al. gelang erstmals eine Auftrennung der Corticoide mit Hilfe der Papierchromatographie (1949, 1950, 1951). Bei der absteigenden Chromatographie wurden die Filterpapierstreifen mit Formamid oder Propylenglykol imprägniert, die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte mit Benzol oder Toluol (beide mit der jeweiligen stationären Phase gesättigt). Das Lösungsmittelsystem Formamid/Benzol eignete sich besonders zur Trennung der weniger polaren Steroide, Propylenglykol/Toluol ergab aber eine bessere Trennung der stärker polaren Komponenten. Teller u. Staib, Vermeulen, Dyrenfurth verwendeten ebenfalls Propylenglykol/Toluol in absteigender Chromatographie. Pechte (55) benutzte zur Trennung sehr polarer Steroide

eine Mischung von Toluol, Petroläther, Butanol, Äthanol und Wasser in absteigender Anordnung. Die Streifen wurden mit Wasser oder lösungsmittelgesättigtem Wasser imprägniert. Schmidt et al. (1953, 67) chromatographierten sieben bis zehn Stunden mit ascendierender Methode und einem hochpolaren Lösungsmittel als mobile Phase (hierzu diente butanolgesättigtes Wasser). Die Imprägnierung der Streifen geschah mit destilliertem Wasser und 10 bis 15 %iger Lösung von Heptanol in Aceton. Bush (1952, 6) verwandte ebenfalls die aufsteigende Methode. Er gab eine Adsorptionschromatographie auf aluminiumimprägniertem Filterpapier an und entwickelte mit Benzol-Chloroform. Bei einer Papierverteilungsmethode nahm er verdünntes Methanol als stationäre Phase, als mobile Phase Leichtpetroleum, Toluol, Methanol, Wasser in bestimmtem Verhältnis. Für relativ polare Steroide führten Mattox u. Lewbart (47) eine Modifikation des Zaffaroni-Systems ein. Sie imprägnierten die Streifen mit 70 % Aceton und 30 % Formamid, als mobile Phase bewährte sich Formamid/Butylacetat/Wasser und auch Äthylenglykol/Butylacetat/Wasser.

Für den qualitativen Nachweis der einzelnen Steroidmetaboliten auf dem Chromatogramm stehen Farbtests und spektrophotometrische Methoden zur Verfügung. Zur Erfassung der auf dem Papier getrennten Komponenten kann auch eine Kontaktphotographie angefertigt werden. Die UV-absorbierenden Banden auf dem Papierstreifen werden herausgeschnitten und das Hormon mit einem Lösungsmittel eluiert. Die quantitative Bestimmung mit einer Gruppenreaktion für Corticoide schließt sich an. (Heftmann, Frantz et al., Vermeulen, Teller u. Staib, Zaffaroni et al. 1950, Gold et al., Ulstrom et al., Hoffmann u. Staudinger). Örtel (53) färbt die Chromatogramme mit Blautetrazol, was zur Entstehung tiefblauer Banden führt, die mit einem Selenzellphotometer ausgewertet werden.

Entsprechend der Vielzahl der angegebenen Methoden wird von den einzelnen Autoren auch die quantitative Ausbeute an Harncorticoiden mit unterschiedlichen Werten angegeben. Wir stellten Ergebnisse zusammen, die mit der Blautetrazol- oder Porter-Silberbestimmung gefunden wurden. Vestergaard (84) konnte unter Benutzung der Girardtrennung 2,8 mg/24 Std. bei männlichen und 3,8 mg/24 Std. bei weiblichen Erwachsenen nachweisen. Nach Chloroformextraktion fanden Silber u. Porter (69) durchschnittlich 6,6 mg, Rivoire (1955, 62) 6 mg, Vermeulen (1957, 83) 2,8 mg bis 7,2 mg/24 Stunden bei männlichen und 2,5 bis 6,4 mg/24 Std. bei weiblichen Untersuchten, Marks et al. (46) 4,4 mg/24 Std., Albeaux-Fernet (1957, 1) 5,7 mg/24 Std., Teller u. Staib (78) 5,9 mg/24 Std., nach Ätherextraktion bzw. Äther und Chloroform) Wilson (85) 2,5 mg/24 Std., Jensen 3,18 bei weiblichen und 4,2 mg/24 Std. bei männlichen Untersuchten, Romani (63) 6,3 mg/24 Std. und nach Äthyl-

acetatextraktion Romanoff (64) 6,42 mg/24 Std., nach Butanolextraktion Reddy (59) durchschnittlich 4,7 mg bei Gesunden und 5,3 mg/24 Std. bei innersekretorisch gesunden Krankenhauspatienten, Moxham (1956, 49) 8,0 bis 21,8 mg/24 Std. bei männlichen und 4,6 bis 17,0 mg/24 Std. bei weiblichen Untersuchten.

Die individuellen C_{21}-Steroide wurden nach Elution der Hormone vom Papierstreifen bestimmt. De Courcy et al. (9) geben für Tetrahydrocortisol einen Wert von 212 µg/24 Std., Romanoff (64) 1,3 mg und Karl u. Raith (36) 1,51 mg/24 Std. an. Von Tetrahydrocortison wurden von de Courcy 1,5 mg/24 Std., von Romanoff 3,81 mg/24 Std. und von Karl u. Raith 2,73 mg/24 Std. nachgewiesen.

Die Ausscheidung von Cortisol und Cortison ist seit den papierchromatographischen Untersuchungen von Zaffaroni et al., die für beide Steroide 40 bzw. 20 µg täglich ergab, noch von Johnson u. Heftman (34) bestimmt worden, der 210 µg für Cortisol und 140 µg für Cortison fand.

Die Aldosteronausscheidung, die seit der ersten Auffindung dieser Substanz durch Simpson et al. (70, 71) Gegenstand häufiger Untersuchungen war, wird von Neher u. Wettstein (1956, 51) mit durchschnittlich o,5 bis 12,5 µg/24 Std., von Sobel et al. (72) mit 5 bis 100 µg/24 Std., von Dyrenfurth et al. (1959, 14 mit 1,4 bis 16,8 µg/24 Std. für männliche und 1,1 bis 7,0 µg für weibliche Untersuchte, von Staub et al. (76) mit 3 bis 16 µg/24 Std. angegeben.

Da nach diesem Überblick über die bisherige Literatur ein Verfahren zur Bestimmung der individuellen C_{21}-Steroide nicht vorlag, das einerseits einfach genug war, um routinemäßig durchgeführt werden zu können, andererseits genau genug, um die Bestimmung der Nebennierenrindensekretionsraten zuzulassen, galt es eine Methode auszuarbeiten, mit der in einem einfachen Arbeitsgang alle wesentlichen C_{21}-Harnsteroide erfaßt werden können. Das Verfahren sollte bei innersekretorisch Gesunden, bei Patienten mit Herzinsuffizienz nach Gabe von Prednison, Dexamethason, Metopiron und nach peroraler Verabreichung von Cortisol, Aldosteron sowie 11-Desoxycortisol angewandt und über die Ergebnisse berichtet werden.

B. METHODIK

1. Hydrolyse und Extraktion

Wir verwandten als Ansatz für die Untersuchungen im allgemeinen einen 48-Stunden Urin oder, wenn bei mutmaßlicher Unterfunktion der Nebennieren eine geringere Corticoidausscheidung als normal zu erwarten war, eine 72-Stunden Menge. Die Spaltung der konjugiert vorliegenden Steroide erfolgt mit 300 Einheiten β-Glucuronidase je ml Urin bei pH 5 und zweitägiger Bebrütung bei 37°C unter Zusatz von Acetatpuffer pH 5. Anschließend stellt man den Ansatz mit verdünnter Salzsäure auf pH 1 ein. Wir extrahieren die wässrige Phase mit einer Apparatur zur Destillation und kontinuierlichen Extraktion mit spezifisch schwererem Lösungsmittel nach Soxleth. Als Lösungsmittel verwenden wir Methylenchlorid. In der Apparatur können 800 bis 1000 ml wässrige Phase damit perforiert werden. Die kontinuierliche Extraktion wird 48 Stunden lang durchgeführt. Die Methylenchloridextrakte werden mit n/2 Natronlauge (0,1 Vol.) geschüttelt und zweimal mit 0,1 Vol. Wasser nachgewaschen. Man engt den Extrakt anschließend bei 50°C zur Trockne ein.

2. Vorreinigung

Den Trockenrückstand gibt man mit 2 ml Girard-Reagens-T (5 g in 20 ml Eisessig ad 100,0 ml Äthanol gelöst) in ein größeres Reagensglas mit Schliff. Nach 12-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur füllt man 8 ml 2,5 %ige Natronlauge hinzu und schüttelt gut um. Dann wird zweimal mit 5 ml eines Lösungsmittelgemisches von Äthylacetat, Chloroform, Methylenchlorid (1:1:1) extrahiert (jeweils 1 bis 2 Minuten kräftig geschüttelt). Die von den beiden Extraktionen gesammelte organische Phase I bringt man in einen kleinen Erlenmeyerkolben. Die wässrige Phase versetzt man mit 1 ml 10 n-Salzsäure und läßt sie 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Danach schüttelt man 4 Minuten mit 10 ml eines Gemisches aus Äthylacetat, Chloroform, Methylenchlorid (1:1:1) kräftig um, anschließend die organische Phase II mit 2 ml Sodalösung (gesättigte Sodalösung, Aqua dest. 1:9) kurz, saugt letztere ab und trocknet den Extrakt im Exsikkator.

Der nächste Reinigungsschritt erfolgt mittels einer Elution aus dem Dextran-Gel Sephadex G 25 (Länge der dazu benötigten Chromatographie-Säule 48 cm, davon Schliff an dem einen Ende 3 cm, Ausflußrohr - Durchmesser 1 mm - am anderen Ende 6 cm). Der Durchmesser der Säule beträgt ca. 2,5 cm. Zum Bepacken läßt man Sephadex G 25 in steriler physiologischer Kochsalzlösung über Nacht quellen und wäscht das Gel dann zehnmal mit dieser Lösung aus. Die

Glassäule verstopft man am unteren Ende mit Glaswolle, füllt sie mit Phosphatpufferlösung (pH 7,35; 0,15 molar), welche als Elutionsmittel dient, und gießt nach und nach das Gel in die Säule. Ist diese gefüllt, so läßt man die Pufferlösung etwa 2 cm überstehen, denn das Gel darf keinesfalls austrocknen, setzt einen dicht abschließenden mit Elutionsflüssigkeit gefüllten Glaskolben mit Hahn am unteren Ende auf und läßt nochmals Phosphatpufferlösung durchtropfen.

Nach der Prüfung der quantitativen Elution von der Sephadex-Säule an Hand eines Tritium-Cortisolstandards und der UV-Durchflußmessung nach Elution von Corticoid-Harnextrakten, wird die Säule mit der zu untersuchenden Fraktion (I u. II getrennt) beschickt. Dazu nimmt man den Harnextrakt in 1,2 ml Aceton auf und fügt 0,8 ml Phosphatpufferlösung hinzu. Die so erhaltene Lösung gibt man quantitativ auf das Dextran-Gel. Nach Einsickern gießt man etwas Pufferlösung auf, schließt die Säule mit dem Tropftrichter ab und eluiert die Corticoide mit 500 ml Phosphatpufferlösung. Der größte Teil der Pigmente bleibt am oberen Rand des Gels hängen. Ist die Elution der Corticoide beendet, so rührt man das Eluat mit einem Gemisch aus Äthylacetat, Chloroform, Methylenchlorid (1:1:1) ca. 2 Stunden mit dem Magnetrührer. Die untere Phase versetzt man zur Entfernung des Wassers mit wasserfreiem Natriumsulfat, klärt und dampft die Flüssigkeit im Rotationsverdampfer bei 50°C ein. Den zurückbleibenden Extrakt I vereinigt man mit dem auf die gleiche Weise gewonnenen Extrakt der Fraktion II.

3. Gruppenbestimmung der C_{21}-Steroide

Nach Lösung des gereinigten Extraktes in 4 ml absolutem Äthanol und Entnahme von je 0,1 ml für die Blautetrazoldoppelbestimmung werden die Alkoholauszüge wieder zur Trockne gebracht. Für die Reaktion nach Mader u. Buck (45) versetzt man das zu untersuchende Material mit 3 ml 95 %igem Alkohol, 0,5 ml Tetramethylammoniumhydroxyd und 0,5 ml Blautetrazol (3:3'-Dianisole-bis-4:4'-(3:5-Diphenyl)-Tetrazoliumchloride).

Den Leerwert und die Standards (10 und 20 µg Cortisol) behandelt man ebenso. Die Lösung schüttelt man gut um und stellt sie eine Stunde bei 25° ins Wasserbad. Die Extinktion der entstandenen roten Farblösung liest man im Kolorimeter (Bausch und Lomb) bei der Wellenlänge 495 mµ ab. Die quantitative Berechnung des Steroidgehaltes erfolgt nach

$$c = \frac{c_S \cdot E}{E_S}, \text{ wobei}$$

c die gesuchte Konzentration,
c_S die Konzentration der Standardsubstanz,

E die gefundene Extinktion des Harnextraktes und
E_S die Extinktion der Standardsubstanz ist.

4. Papierchromatographische Trennung der Harnextrakte

Je nach Größe der Steroidausbeute verwendet man 2 oder 4 cm breite Filterpapierstreifen (Schleicher & Schüll Nr. 2043 b mgl, Länge 72 cm). In 10 cm Abstand vom oberen Streifenrand markiert man die Startlinie für den Auftrag der Corticoide. Zur Imprägnierung zieht man die Streifen durch eine in einem Becherglas befindliche Mischung von 70 ml Aceton und 30 ml Formamid. Überschüssiges Imprägnierungsmittel schüttelt man leicht ab. Während die Streifen trocknen, löst man den Extrakt in 0,1 bis 0,2 ml Chloroform und zieht ihn in der Agla-Mikrometerspritze auf. Für den Auftrag bedient man sich einer vorne abgewinkelten Kanüle. Die Papierstreifen legt man nun auf eine mit Aceton sorgfältig gereinigte Glasplatte, der oberhalb der Startlinie liegende Teil wird zwischen zwei kleineren Glasplatten festgehalten, die Startlinie besitzt keine direkte Unterlage. Zum Trocknen des Auftrags schaltet man einen kalten Föhn ein. Um zu verhindern, daß sich die Ränder gegenüber der Mitte mit Stroidmaterial überladen, bringt man den Extrakt etwa 0,05 cm vom Rand entfernt auf das Papier und setzt auf die Gegenseite in diesem Abstand wieder ab. Man knickt die Papierstreifen oben um und hängt sie in die Rinnen des Chromatographiekastens, wo sie von zwei dicken, übereinanderliegenden Glasstäben gleichmäßig festgehalten werden. Nun füllt man die Rinnen mit der mobilen Phase, einer formamidgesättigten Mischung von 250 ml Benzol und 250 ml Chloroform. Den Chromatographiekasten deckt man mit einer Glasplatte ab und beschwert diese mit einem Bleiring. Zum Schutz gegen Tageslicht umhüllt man den Kasten mit einem schwarzen Tuch. Die Laufzeit der Chromatogramme bis zum Streifenende beträgt 4 bis 5 Stunden. Danach nimmt man die Streifen heraus, legt sie hochkant und läßt sie über Nacht trocknen.

5. Anfärbung der Chromatogramme

Die Farbreaktion der C_{21}-Steroide auf dem Filterpapierstreifen gelingt am besten mit einer 0,2 %igen Blautetrazol-Piperonyl-Lösung in 10 %iger Natronlauge (1:1). Den Filterpapierstreifen zieht man langsam und gleichmäßig durch die Farblösung in einer flachen Färbeschale. Nach 1 bis 2 Minuten zeigen sich bereits blaue Banden, je nach Steroidgehalt mehr oder weniger breit und von verschiedener Farbintensität. Nach Auswaschen des Farbstoffüberschusses in

Aqua dest. spannt man die Chromatogramme horizontal unter einem kalten Föhn auf einem entsprechenden Gestell aus, um ein Auslaufen der Farbe auf dem Filterpapier zu verhindern.

6. Identifizierung der Banden

Die Identifizierung der Blautetrazol-positiven Zonen erfolgte zunächst einmal an Hand der R_f-Mittelwerte entsprechender reiner Steroide. Tab. I gibt einen Überblick über die durchschnittlichen R_f-Werte, zum Vergleich daneben sieht man die R_f-Werte der den reinen Steroiden entsprechenden Blautetrazol-positiven Banden im Harnextrakt (Durchschnittswerte von 16 Chromatogrammen). An reinen Steroiden wurden verwandt: Tetrahydrocortisol, Tetrahydroaldosteron*, Tetrahydrocortison, Cortisol, Dihydrocortisol, Aldosteron, Cortison, Dihydrocortison, Tetrahydrocorticosteron, Tetrahydro-11-Desoxycortisol, Tetrahydro-11-Dehydrocorticosteron, Corticosteron, 11-Desoxycortisol, Dihydrocorticosteron, Dihydro-11-Desoxycortisol, 11-Dehydrocorticosteron, Dihydro-11-Dehydrocorticosteron und 11-Desoxycorticosteron. Bei den Tetra- und Dihydroderivaten der Cortine wurden auch die Allo-Komponenten untersucht. Um einen weiteren Aufschluß über die Reinheit der in den Blautetrazol-positiven Banden vorliegenden Steroide zu erhalten, fertigten wir sowohl von der Standardsubstanz als auch von den Eluaten der zu identifizierenden Banden UV-Spektra und Spektren in konzentrierter Schwefelsäure an, die eine gute Übereinstimmung ergaben. Ausserdem zeigte sich bei der abschließend durchgeführten gemischten Identifizierung der Steroide mit Standards, daß in allen Fällen die geprüften Eluate der Blautetrazol-positiven Banden zusammen mit den entsprechenden reinen Steroiden ohne Differenz in der Laufstrecke bis nahezu zum Ende des Streifens liefen. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte dabei z.T. länger als vorher angegeben.

7. Quantitative Bestimmung der individuellen C_{21}-Steroide

Zur quantitativen Auswertung der einzelnen Banden schreibt man ein Extinktionsdiagramm im "Spinco-Analytrol" (Fa. Beckman) im Absorptionsmaximum bei 600 mμ (B 2-Cam.). Da die Farbintensität der Banden der Menge an hierin vorliegenden 17,21-Hydroxy-20-Ketosteroiden bzw. 21-Hydroxy-20-Ketosteroiden proportional ist, entspricht die integrierte Flächengröße der Ex-

---

* Herrn Dr. Neher danken wir für die Überlassung der Reinsubstanz.

Tabelle I

C_{21}-Steroide	R_f-Werte der Banden von Standardsubstanzen	R_f-Werte der Banden von entsprechenden Steroiden im Urin
Tetrahydrocortisol	0,04	0,02
Tetrahydroaldosteron	0,06	0,05
Cortisol Tetrahydrocortison	0,08	0,07
Dihydrocortisol	0,17	0,12
Aldosteron	0,18	0,16
Cortison	0,24	0,21
Dihydrocortison	0,31	0,25
Tetrahydrocorticosteron	0,36	0,33
Tetrahydro-11-Desoxycortisol	0,40	0,42
Tetrahydro-11-Dehydrocorticosteron	0,57	0,51
Corticosteron 11-Desoxycortisol	0,59	0,59
Dihydrocorticosteron Dihydro-11-Desoxycortisol	0,72	0,68
Tetrahydrcdesoxy-corticosteron		0,74
11-Dehydrocorticosteron	0,83	0,83
Dihydro-11-Dehydro-corticosteron	0,89	0,89
Desoxycorticosteron	0,95	0,96

tinktionsdiagramme der einzelnen Banden dem relativen Gehalt an Blautetrazol-positiven Steroiden. Man kann dann leicht die endgültige Auswertung der Chromatogramme so vornehmen, daß man jeweils von dem Punkt des Diagramms, an welchem sich die Extiktionsschreibung einer Bande über die Null-Linie erhebt und an dem Punkt, wo die Schreibung wieder dorthin zurückkehrt, das Lot auf die Schreibung der Integrierung fällt. Die relative Flächengröße wird dann in der üblichen Weise durch Zählung der Zäckchen zwischen den beiden Strichen bestimmt. Sind zwei Banden zwar nach dem visuellen Eindruck auf dem Chromatogramm getrennt, ohne daß jedoch die Fußpunkte der jeweiligen Extinktionskurven dazwischen die Grundlinie erreichen, kann vom tiefsten Einschnitt zwischen den Extinktionskurven das Lot auf die Grundlinie gefällt und so eine zur Berechnung der Flächengrößen notwendige Abgrenzung erzielt werden. Die relativen Mengen der in den Banden enthaltenen Corticoide können entsprechend der Gesamtausscheidung auf Absolutwerte umgerechnet werden.

Verwendet man den Extinktionsschreiber II Zeiss, wird das Chromatogramm nach erfolgter Anfärbung der Banden sofort in Paraffinöl gebracht und das Gefäß mit dem Transparenzöl in den Exsikkator bei starkem Sog so lange gestellt, bis die obere Schicht des Öls mit Luftblasen bedeckt ist, dann nimmt man den Streifen heraus, bringt ihn zwischen zwei 56 cm lange, 4 cm breite Glasplatten und wertet die Chromatogramme wie Papierelektrophoresestreifen aus. Dabei ist zu beachten, daß die Länge des Transportes für die Länge der Glasplatten nicht ausreicht, so daß jeweils beim Schreiben eines neuen Abschnittes des Streifen der Zusammenhang mit dem alten durch Wiederholung des letzten Abschnittes der Schreibung hergestellt werden muß. Die einzelnen Abschnitte des Papiers, welches die Extinktionskurven enthält, werden dann aneinandergeklebt. Nach Ziehen der Grundlinie (entsprechend den Fußpunkten der einzelnen Extinktionskurven) kann die planimetrische Auswertung zur Bestimmung der Flächengröße der einzelnen Extinktionskurven der Banden erfolgen. Man verfährt bei der Einteilung der Chromatogramme, der Umrechnung der Planimeterwerte der Banden in Prozentanteile und der Berechnung der Absolutmengen der individuellen C_{21}-Steroide wie vorher.

C. ERGEBNISSE

1. Ergebnisse bei der Vorreinigung mit verschiedenen Modifikationen der Girardtrennung

Im Hinblick auf das Ziel einer analytischen Chromatographie der C_{21}-Steroide in einem Arbeitsgang legten wir besonderes Gewicht auf eine gründliche, aber möglichst schonende Vorreinigung der Harnextrakte. Wir führten deshalb zur weiteren Reinigung der noch sehr pigmentreichen Rohextrakte Untersuchungen über eine diesem Zwecke entsprechende Modifikation der Girardtrennung durch. Tabelle II gibt zunächst einen Überblick über die Ergebnisse unserer Untersuchungen mit verschiedenen Modifikationen der Girard-Trennung. Hierbei wurden als Reinsubstanzen verwandt: Cortisol, Tetrahydrocortisol, Dihydrocortisol, Aldosteron, Cortison, Corticosteron, 11-Desoxycortisol, Tetrahydro-11-Desoxycortisol und Desoxycorticosteron.

Tabelle II

a)

Girard - Trennung der C_{21}-Steroide
(zugefügte Menge jeweils 100 µg Steroid)

C_{21}-Steroide	Fraktion I	Fraktion II	insgesamt
	(Wiederauffindung in %)		
Cortisol	24,70	58,82	83,52
Tetrahydrocortisol	23,52	48,23	71,75
Dihydrocortisol	30,97	27,95	58,92
Aldosteron	35,00	26,47	61,47
Cortison	-	79,60	79,60
Corticosteron	-	93,16	93,16
11-Desoxycortisol	-	68,32	68,32
Tetrahydro-11-Desoxycortisol	-	47,05	47,05
11-Desoxycortocosteron	14,34	81,06	95,40

b)

Girard - Trennung der C_{21}-Steroide nach dem für C_{19}-Steroide üblichen Verfahren nach 1 stdg. Erhitzen auf 80°C mit Girard's Reagens-T u. Extraktion der Fraktion I mit Äther, der Fraktion II mit Äther: Tetrachlorkohlenstoff (1:4)

C_{21}-Steroide	Fraktion I	Fraktion II	insgesamt
Cortisol	16,6	2,7	19,3
Tetrahydrocortisol	13,3	7,3	20,6
Dihydrocortisol	16,1	1,5	17,6
Corticosteron	-	15,6	15,6
11-Desoxycortisol	-	30,0	30,0
Desoxycorticosteron	-	16,5	16,5

c)

Girardtrennung wie b)
(Beide Fraktionen mit Chloroform ausgeschüttelt)

C_{21}-Steroide	Fraktion I	Fraktion II	insgesamt
Corticosteron	-	39,60	39,60
11-Desoxycortisol	-	65,78	65,78
Desoxycorticosteron	-	10,31	10,31

d)

Girardtrennung nach Lindner

C_{21}-Steroide	Fraktion I	Fraktion II		insgesamt
		Ketofrakt. A	Ketofrakt. B	
Cortisol	1,45	27,30	2,29	31,04
Tetrahydrocortisol	64,70	-	-	64,70
Dihydrocortisol	19,19	-	3,27	22,46
Aldosteron	6,98	0,76	-	7,74
Cortison	-	12,69	-	12,69
Corticosteron	2,93	33,15	16,47	52,55
11-Desoxycortisol	7,27	15,38	4,50	27,15
Tetrahydro-11-Desoxycortisol	80,88	-	4,91	85,79
11-Desoxycorticosteron	1,38	13,84	18,68	34,35

Bei einer vorgelegten Menge von jeweils 100 µg und Anwendung der angegebenen Vorschrift für die Girardtrennung fanden wir von Cortisol, Tetrahydrocortisol, Dihydrocortisol und Aldosteron in der entsprechenden Reihenfolge 24,7; 23,52; 30,97 bzw. 35,0 % in Fraktion I, außerdem in geringerer Menge 11-Desoxycorticosteron. Von den übrigen Steroiden konnten wir keine Reste in dieser Fraktion nachweisen. Dafür fanden wir sie quantitativ in der Ketofraktion II neben den Anteilen der vorher genannten Substanzen. Insgesamt konnten wir durchschnittlich 73,24 % der zugesetzten Steroide nach Girardtrennung wieder nachweisen.

Zum Vergleich zeigen Tab. II b) und c) die Wiederauffindung von C_{21}-Steroiden nach dem bei C_{19}-Steroiden verwandten Verfahren der Girardtrennung (22). Nach der üblichen Methode für die Gewinnung der 17-Keto-Steroidfraktion (b) findet man lediglich ganz geringe Beträge der zugeführten Substanzen wieder und zwar für Cortisol in Fraktion I 16,1 % und in der Ketofraktion (II) 2,7 %. In ähnlicher Größenordnung werden auch die Derivate von Cortisol (Tetrahydrocortisol, Dihydrocortisol) wieder aufgefunden, Corticosteron und Desoxycorticosteron mit 15,6 bzw. 16,5 % und schließlich 11-Desoxycortisol mit 30,0 % in etwas größerer Menge. In Fraktion I lassen sich die zuletzt genannten drei Steroide nicht nachweisen. Auch nach Chloroformextraktion

beider Fraktionen (c), ist dies der Fall. Corticosteron wird gegenüber vorher in gering vermehrtem Betrage nachgewiesen, die Wiederauffindung von 11-Desoxycortisol ist deutlich vermehrt.

Das von Lindner (40) angegebene Verfahren zur Girardtrennung von C_{21}-Steroiden zeigt, entsprechend einer wesentlich verschiedenen Methodik, andere Ergebnisse (d). Hier finden wir in der Ketofraktion (II) nur 27,3 % Cortisol wieder, in Fraktion I (Nichtketofraktion nach Lindner) einen praktisch zu veranachlässigenden Betrag. Tetrahydrocortisol läßt sich alleine mit 64,7 % in der Fraktion I nachweisen, Dihydrocortisol mit 19,9 %, in der zweiten Ketofraktion (Ketofraktion B nach Lindner) mit 3,27 %. Die Ausbeute von Cortison in der Ketofraktion A ist mit 12,69 % denkbar gering, desgleichen diejenige von Desoxycorticosteron mit 13,84 % und von 11-Desoxycortisol mit 15,38 %. Die von Corticosteron liegt mit 33,15 % etwas höher, hier findet man, wie ebenfalls bei Desoxycorticosteron, eine mit 16,47 % bzw. 18,68 % vermehrte Fraktion I (Nichtketone nach Lindner) Wie Tetrahydrocortisol ist auch Tetrahydro-11-Desoxycortisol mit 80,88 % hauptsächlich in der Nichtketofraktion vertreten. Aldosteron erscheint mit 7,74 % insgesamt in ganz geringer Menge wieder.

Es erweist sich also, was die Ausbeute an reinen C_{21}-Steroiden nach Girardtrennung anbetrifft, das schonendste Verfahren unter Vermeidung der Erhitzung, bei einem Vergleich mit den anderen, als überlegen. Bei der Arbeitsvorschrift nach Lindner, die an sich auch ein schonendes Verfahren für die C_{21}-Steroidextrakte darstellt, sind die Verluste an steroidhaltigem Material erheblich grösser. Wir haben deshalb als ersten Schritt der Vorreinigung bei der C_{21}-Steroidpräparation die bei (a) verwandte Modifikation der Girardtrennung gewählt.

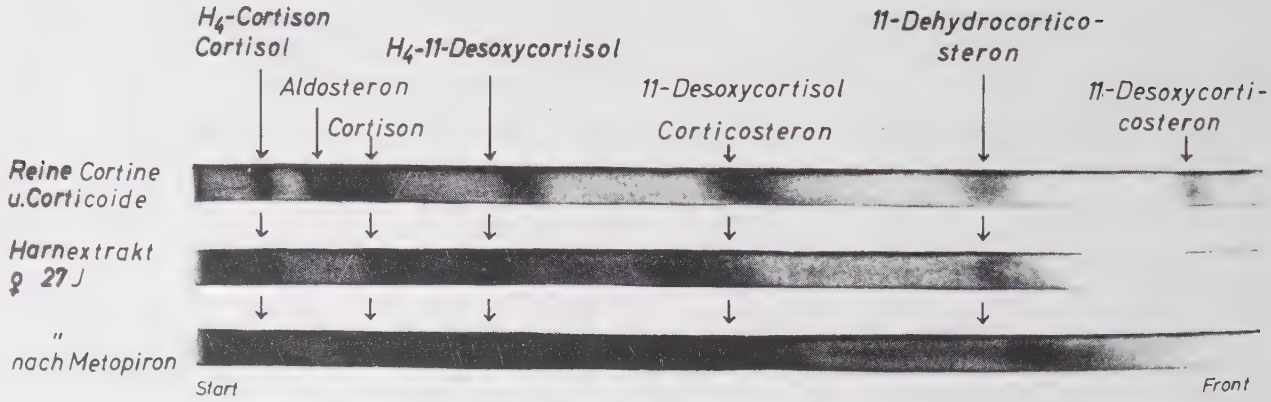
2. Beschreibung der Chromatogramme und der Extinktionsdiagramme

Einen Überblick über die Sequenz der reinen Steroide Tetrahydrocortisol, Tetrahydrocortison und Cortisol, Aldosteron, Cortison, Tetrahydro-11-Desoxycortisol, 11-Desoxycortisol und Corticosteron, 11-Dehydrocorticosteron und 11-Desoxycorticosteron gibt Abb. 1 in der obersten Reproduktion eines Originalchromatogrammes. Bei der Entwicklung der Chromatogramme der C_{21}-Steroidfraktion eines normalen Harnextraktes finden sich nach Anfärben mit Blautetrazol (Piperonyl) die gleichen Banden, wie die Markierung mit Pfeilen aufweist, lediglich Aldosteron und Desoxycorticosteron sind in dem Harnextrakt in so geringer Menge enthalten, daß die Färbung in der Reproduktion nicht zu sehen ist. Die chromatographische Trennung der einzelnen Banden ist sowohl bei der Verwendung von Standardsubstanzen als auch von Harnextrakten stets gleichmäßig gut. Eine

Papierchromatographische Trennung

der C_{21}-Steroidfraktion

(Lösungsmittelsystem: Formamid-Aceton / Benzol-Chloroform)



Ausnahme macht 11-Desoxycortisol (Reichstein-S), das von Corticosteron nur unvollkommen zu trennen ist. Die unterste Reproduktion dieser Abbildung zeigt den gleichen Harnextrakt nach Gabe von Metopiron, mit einer beträchtlichen Vermehrung von Tetrahydro-11-Desoxycortisol.

Abb. 1 läßt erkennen, daß im Lösungsmittelsystem Formamid-Aceton/Benzol-Chloroform eine papierchromatographische Trennung der C_{21}-Steroidfraktion in befriedigender Weise gelingt. Die im Urin zu erwartenden Hauptkomponenten zeigen dabei eine annähernd gleiche Laufzeit wie die reinen Steroide.

Als Beispiel für die Auswertung der Chromatogramme sind in Abb. 2 Extinktionsdiagramme der C_{21}-Steroidfraktion bei einer 68 Jahre alten Patientin mit einer Herzinsuffizienz originalgetreu reproduziert. Es fällt die relativ große Ausscheidungsmenge von Aldosteron auf, außerdem eine relativ größere Ausscheidung von Tetrahydrocorticosteron im Vergleich mit dem durchschnittlichen Normalwert.

Das darunter liegende Extinktionsdiagramm gibt die entsprechenden Anteile der einzelnen Banden nach Gabe von Prednison wieder. Man sieht hier eine Reduktion der Metaboliten von Cortisol und Cortison (Tetrahydrocortisol und Tetrahydrocortison) bzw. von Cortisol und Cortison selbst. Relativ unbeeinflußt erscheint dagegen die Fraktion Tetrahydrocorticosteron. Sie hat gegenüber vorher eher zugenommen.

Auf der untersten Reproduktion dieser Abbildung sehen wir den gleichen Harnextrakt nach Gabe von Metopiron mit einer erheblichen Zunahme der Tetrahydro-11-Desoxycortisol-Fraktion. Die anderen Komponenten sind dementsprechend relativ vermindert. Insgesamt läßt sich auf Grund der Extinktionsdiagramme der relative Anteil der individuellen C_{21}-Steroide mit hinreichender Genauigkeit berechnen. Veränderungen des Ausscheidungsmusters der C_{21}-Steroide nach Prednison und Metopiron sind auf diese Weise leicht erfaßbar.

3. Individuelle C_{21}-Steroide innersekretorisch Gesunder und Veränderung der Ausscheidung nach Gabe von Dexamethason

In Tabelle III sind unsere Untersuchungsergebnisse bei innersekretorisch Gesunden zusammengestellt. Sie geben einen Überblick über die individuellen C_{21}-Steroide, soweit diese nach papierchromatographischer Trennung einwandfrei identifizierbar waren. Im Durchschnitt fanden wir bei innersekretorisch Gesunden eine C_{21}-Steroidausscheidung von 1,43 mg/24 Std. Nach Anfärbung mit Blautetrazol zeigten sich bei allen Untersuchten die Banden von Tetrahydrocortisol, Tetrahydrocortison und Cortisol, Tetrahydrocorticosteron, Tetrahydro-11-Desoxycortisol, Corticosteron und 11-Desoxycortisol deutlich sichtbar und abgrenzbar.

Extinktionsdiagramme der C_{21}-Steroidfraktion

(68 J ♂, Herzinsuffizienz)

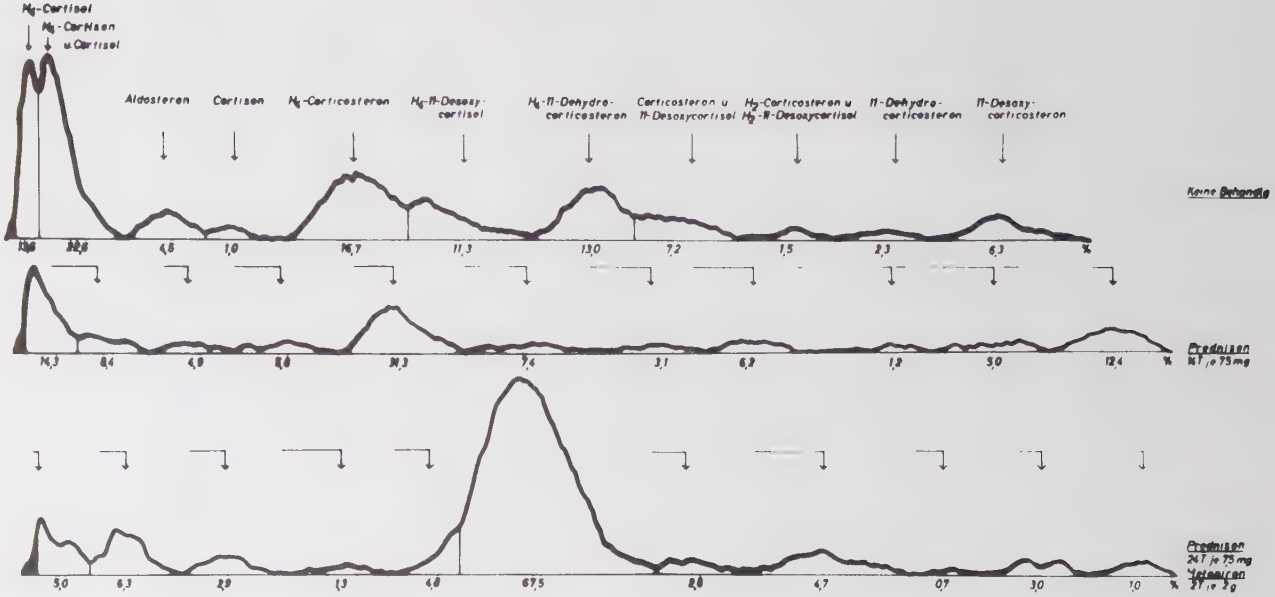


Tabelle III

Corticoidausscheidung bei innersekretorisch Gesunden (mg/24 Std.)

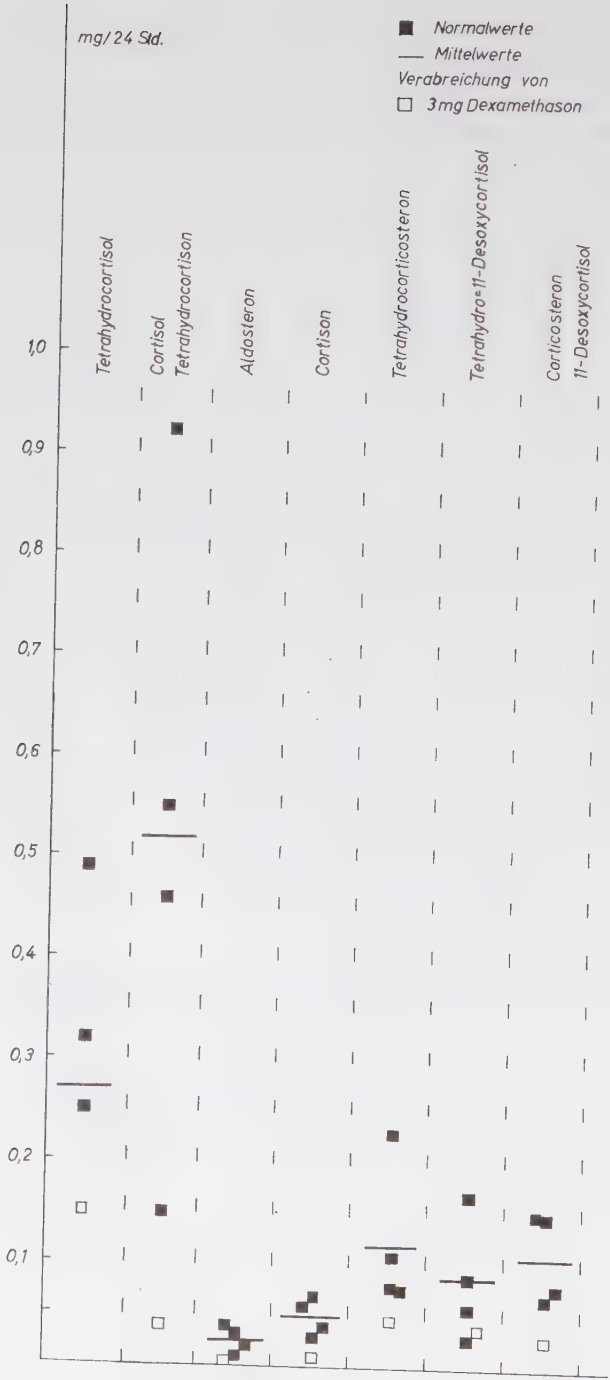
Name	Alter	Geschlecht	17,21 Dihydroxy- u. 21-Hydroxy-20-Keto-steroide	Tetrahydro-Cortisol	Tetrahydro-Cortison	Aldosteron	Cortison	Tetrahydro-corticosteron	Tetrahydro-11-Desoxycortisol	Corticosteron u. 11-Desoxycortisol	Unidentifiz. Banden
A.K.	21 J.	w.	1,08	0,041 3,79 %	0,558 51,66 %	0,011 1,01 %	0,032 2,95 %	0,078 7,22 %	0,06 5,55 %	0,152 14,07 %	0,154 13,75 %
M.Z.		w.	0,904	0,25 27,2 %	0,15 17,4 %	0,035 4,3 %	0,07 8,0 %	0,075 7,3 %	0,03 4,2 %	0,07 8,0 %	0,210 23,23 %
G.H.	32 J.	m.	1,36	0,32 24,0 %	0,46 34,0 %	0,023 1,7 %	0,039 2,88 %	0,109 8,0 %	0,091 6,7 %	0,078 5,76 %	0,228 16,77 %
I.K.	19 J.	w.	2,39	0,49 20,8 %	0,92 38,1 %	0,04 1,84 %	0,06 2,68 %	0,23 9,2 %	0,17 7,07 %	0,15 6,2 %	0,32 13,38 %
Mittelwerte			1,43	0,275 18,94 %	0,522 36,57 %	0,027 1,88 %	0,050 3,49 %	0,123 8,60 %	0,087 6,08 %	0,112 7,83 %	0,228 15,94 %
nach Dexamethason, 3 mg/24 Std.											
I.K.	19 J.	w.	0,39	0,15 38,1 %	0,044 11,2 %	0,005 1,37 %	0,01 2,74 %	0,047 11,8 %	0,043 11,2 %	0,03 7,95 %	0,06 15,65 %

Die Zonen von Aldosteron und Cortison waren nur schwach ausgeprägt und häufig an der Grenze der Nachweisbarkeit.

Für Tetrahydrocortisol fanden wir im Durchschnitt 0,275 mg/24 Std., das sind 18,94 % des Durchschnittswertes der Gesamtausscheidung in 24 Std. an Blautetrazol-positiven C_{21}-Steroiden, rund also ein Fünftel. Die Variationsbreite liegt für Tetrahydrocortisol zwischen 0,04 und 0,49 mg/24 Std., für Cortisol und Tetrahydrocortison bei 0,15 bis 0,92 mg/24 Std. Der Durchschnittswert für diese beiden Komponenten beträgt 0,522 mg/24 Std., er liegt also doppelt so hoch wie bei Tetrahydrocortisol alleine und beträgt damit etwa ein Drittel der Gesamtausscheidung. Aldosteron wird durchschnittlich mit 27 µg/24 Std. ausgeschieden, Cortison mit 50 µg/24 Std., Tetrahydrocorticosteron mit 123 µg, Tetrahydro-11-Desoxycortisol mit 87 µg/24 Std., Corticosteron und 11-Desoxycortisol mit 112 µg/24 Std. Diese Komponenten machen also etwa ein Viertel des gesamten C_{21}-Steroidmaterials aus. Von den letztgenannten Komponenten liegt für Tetrahydrocorticosteron die Ausscheidung am höchsten, dann folgen in der Reihenfolge eines jeweils geringeren Ausscheidungsbetrages die Fraktionen Corticosteron und 11-Desoxycortisol, Tetrahydro-11-Desoxycortisol, Cortison und schließlich Aldosteron. Die Variationsbreite innerhalb der einzelnen Fraktionen beträgt bei Aldosteron 0,01 bis 0,04 mg/24 Std., Cortison weist Werte zwischen 0,03 und 0,07 mg/24 Std. auf, Tetrahydrocorticosteron zwischen 0,075 und 0,023 mg/24 Std., Tetrahydro-11-Desoxycortisol 0,03 und 0,17 mg/24 Std., Corticosteron und 11-Desoxycortisol haben eine Streubreite von 0,07 bis 0,15 mg/24 Std.

Einen Überblick gibt im einzelnen Abb. 3. Die Werte der individuellen C_{21}-Steroide bei innersekretorisch Gesunden sind als schwarze Felder (▮) eingetragen, außerdem die Durchschnittswerte innerhalb der einzelnen Fraktionen (—). Man sieht, daß die Tetrahydroderivate von Cortisol und Cortison neben der Ausscheidung von reinem Cortisol, bei einem Vergleich mit den übrigen Komponenten, relativ vermehrt sind.

Nach Gabe von Dexamethason (□ Abb. 3) finden wir eine erhebliche Reduktion der einzelnen Fraktionen. Tetrahydrocortisol ist auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes (I.K., s. Tab. III) reduziert, in besonderem Maße Cortisol und Tetrahydrocortison, die jetzt etwa ein Zwanzigstel desselben betragen, Cortison etwa ein Sechstel, während die Aldosteronausscheidung von 40 µg auf 5 µg/24 Std. abnimmt. Die Ausscheidung der übrigen Komponenten ist durchschnittlich auf etwa ein Fünftel des Ausgangswertes reduziert.


mg/24 Std.
Normalwerte
Mittelwerte
Verabreichung von
3 mg Dexamethason
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
Tetrahydrocortisol
Cortisol
Tetrahydrocortison
Aldosteron
Cortison
Tetrahydrocorticosteron
Tetrahydro-11-Desoxycortisol
Corticosteron
11-Desoxycortisol

4. C_{21}-Steroidausscheidung nach peroraler Verabreichung von Cortisol, 11-Desoxycortisol und Aldosteron

Einen Überblick gibt die Abbildung 4. Diese zeigt eine deutlich vermehrte Ausscheidung von Tetrahydrocortisol (■) nach Gabe von je 100 mg Cortisol drei Tage lang, von Tetrahydro-11-Desoxycortisol (▤) nach dreitägiger Verabreichung von je 100 mg 11-Desoxycortisol (Reichstein-S). Man findet im einzelnen einen Mehrbetrag von 0,56 mg Tetrahydrocortisol und von 1,01 mg Tetrahydro-11-Desoxycortisol im Vergleich mit den Ausgangswerten (s. a. Tab. IV). Auch nach Verabreichung von Aldosteron (▨) kommt es zu einer eindeutig feststellbaren Ausscheidung des Tetrahydroderivates. Tetrahydroaldosteron wird nach täglicher Verabreichung von 0,5 mg Aldosteron mit 0,23 mg, also fast der Hälfte der verabreichten Substanz entsprechend, im Urin wieder ausgeschieden.

Die übrigen Komponenten werden im letzt genannten Falle einer Patientin mit Morbus Addison gegenüber der Norm in vermindertem Betrag im C_{21}-Steroidextrakt gefunden. So lassen sich 0,17 mg/24 Std. Tetrahydrocortisol gegenüber normal durchschnittlich 0,275 mg/24 Std. und 0,27 mg/24 Std. Tetrahydrocortison nebst Cortisol gegenüber 0,522 mg/24 Std., also in beiden Fällen lediglich die Hälfte der Norm, nachweisen. Cortison ist mit 30 µg ebenfalls gegenüber der Norm vermindert, desgleichen die Ausscheidung von Tetrahydrocorticosteron und 11-Desoxycortisol nebst Corticosteron. Die Ausscheidung von Tetrahydro-11-Desoxycortisol liegt im Normbereich.

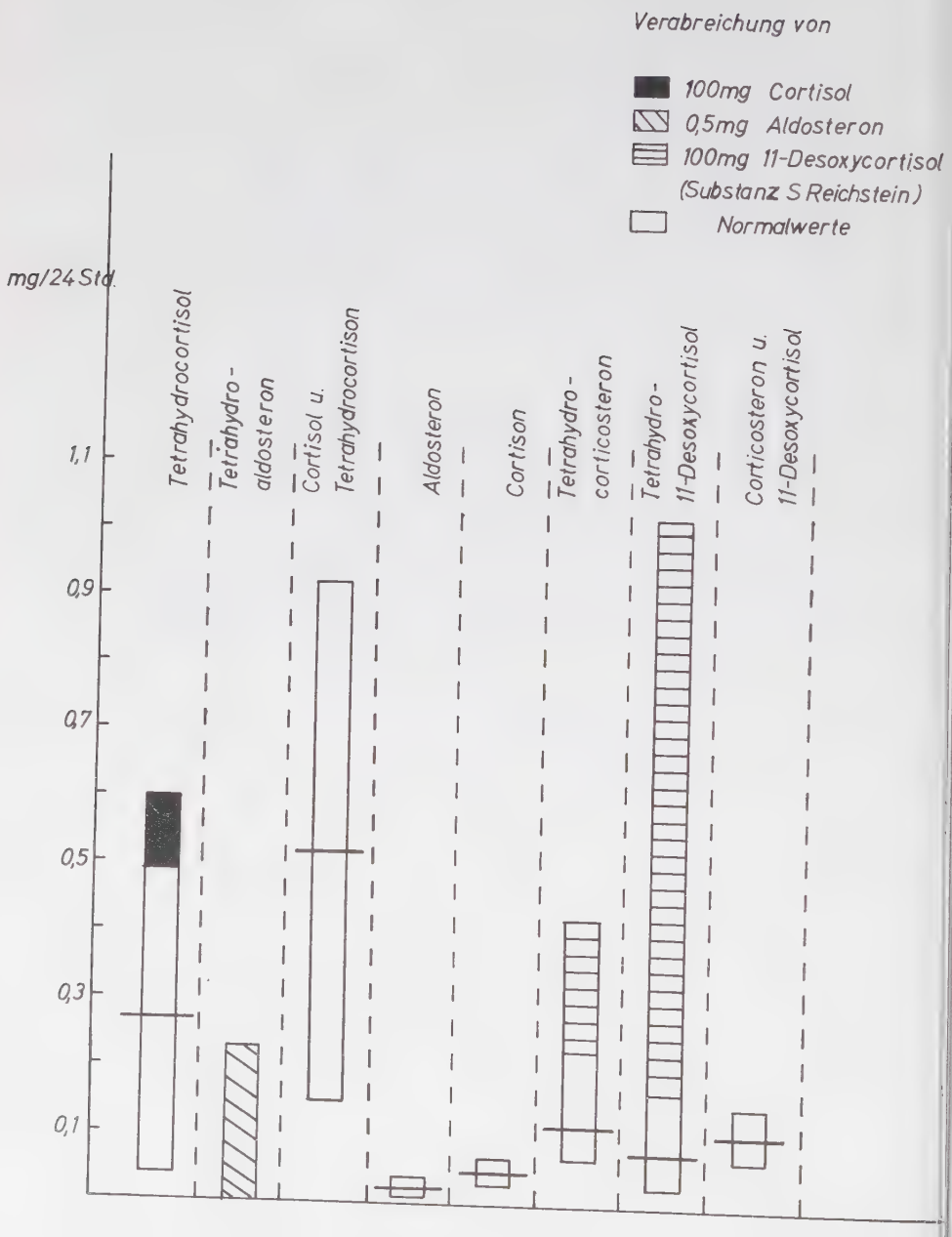

Verabreichung von
100mg Cortisol
0,5mg Aldosteron
100mg 11-Desoxycortisol
(Substanz S Reichstein)
Normalwerte
mg/24 Std.
1,1
0,9
0,7
0,5
0,3
0,1
Tetrahydrocortisol
Tetrahydro-aldosteron
Cortisol u. Tetrahydrocortison
Aldosteron
Cortison
Tetrahydro-corticosteron
Tetrahydro-11-Desoxycortisol
Corticosteron u. 11-Desoxycortisol

Tabelle IV

C_{21}-Steroidausscheidung nach peroraler Verabreichung von Cortisol, 11-Desoxy-Cortisol und Aldosteron (mg/24 Std.)

Name	Alter	Geschlecht	Diagnose	17,21 Dihydroxy- u. 21-Hydroxy-20-Keto-steroide	Tetrahydro-Cortisol	Tetrahydro-aldosteron	Cortisol, Tetra-hydrocortison	Aldosteron	Cortison	Tetrahydro-corticosteron	Tetrahydro-11-Desoxycortisol	Corticosteron u. 11-Desoxycortisol	Unidentifiz. Banden
L.J.	29 J.	w.	konstitut. Hirsutismus	1,60	0,04 25 %	- -	1,12 70 %	0,03 1,8 %	0,03 1,8 %	0,045 2,71 %	0,11 6,85 %	0,061 3,81 %	0,172 10,65 %
					nach Cortisol, 3 Tage je 100 mg								
L.J.	"	"	"	2,185	0,60 27,3 %	- -	0,81 37,2 %	0,025 1,29 %	0,065 2,86 %	0,085 3,88 %	0,16 7,2 %	0,08 3,68 %	0,35 16,59 %
					nach 11-Desoxycortisol (Cp.S.) 3 Tage je 100 mg								
L.J.	"	"	"	2,94	0,33 11,2 %	- -	0,715 24,1 %	0,02 0,79 %	0,07 2,48 %	0,42 14,1 %	1,12 38,1 %	0,1 3,57 %	0,18 5,66 %
					nach Aldosteron 0,5 mg/24 Std.								
K.K.	79 J.	w.	Morbus Addison	1,16	0,17 14,7 %	0,23 19,0 %	0,27 23,3 %	0,02 1,8 %	0,03 2,6 %	0,02 1,8 %	0,15 13,0 %	0,04 3,5 %	0,232 20,3 %

D. DISKUSSION

Bei einer Methode zur Bestimmung der Cortine und Corticoide im Urin entscheidet der Zweck über die Auswahl der hierzu notwendigen Mittel. Handelt es sich lediglich um Mengenbestimmungen, wird man mit einer Doppelisotopenanalyse und relativ kleinem Ansatz am besten fahren (Kliman u. Peterson, 1960, 38). Will man jedoch Nebennierenrindensekretionsraten bestimmen, dann kommt man auch nach neueren diesbezüglichen Untersuchungen ohne den bisher üblichen großen Urinansatz - wir verwandten eine 48 Stundenmenge - nicht aus (16, 18, 35, 42, 43, 48, 68, 81).

Da die untersuchten Steroide großenteils an Schwefelsäure und Glucuronsäure gebunden vorliegen, müssen sie aus diesen Verbindungen mittels Hydrolyse freigesetzt werden. Um eine gute Ausbeute an Steroidmaterial zu gewährleisten, ist die fermentative Hydrolyse neben der pH 1-Hydrolyse auf jeden Fall notwendig. So wird z.B. von Aldosteron durch pH 1-Hydrolyse lediglich das als 3-Oxo-Konjugat vorliegende frei, während sein Tetrahydroderivat dem Nachweis entgeht.

Anschließend erwächst die Schwierigkeit der Aufarbeitung dieser großen Uringmengen, die, wenn man sie mit den üblichen Lösungsmitteln extrahiert, häufig Emulsionen bilden. Wir haben bisher eine Ausschüttelung mit Methylenchlorid, Chloroform, Essigester (1:1:1) durchgeführt, oder eine Extraktion mittels Durchtropfen von Lösungsmittel in der Glassäule, haben aber in der letzten Zeit diese Methoden gänzlich zu Gunsten der viel einfacheren kontinuierlichen Methylenchloridextraktion verlassen. Nach der 2 Tage dauernden Glucuronidase-Spaltung kann man bereits während der pH 1-Hydrolyse eine Extraktion ebenfalls 2 Tage lang durchführen und damit eine befriedigende Steroidausbeute erhalten. Hand in Hand mit einer größeren Ausbeute geht eine Zunahme der unspezifischen Beimengungen gegenüber früher. Da die Mengen der zu untersuchenden Substanz gering sind, muß ein besonderes Gewicht auf die Vorreinigung gelegt werden. Neben der üblichen Ausschüttelung mit verdünnter Natronlauge und Wasser, haben wir zunächst, in Anlehnung an Schmidt et al. (1953, 67) als ersten präparativen Arbeitsgang eine Papierchromatographie des Extraktes auf breiten Bogen im System Heptanol/Wasser absteigend bis unten durchgeführt und nach Herausschneiden der Pigmentbanden am Start die auf dem Streifen vorliegenden Steroide mit Methanol eluiert. Das eingeengte Eluat wurde dann einer zweiten Reinigung auf der Kieselgel-Säule (Elution mit Äthanol in Methylenchlorid) unterzogen. Diesen zeitraubenden Arbeitsgang haben wir im Hinblick auf die geplante routinemäßige Anwendung der Bestimmung durch eine Modifikation der Girardtrennung und eine weitere Reinigung über Detran-Gel ersetzt. Dabei kann an jedem folgenden Tag ein weiterer Reinigungsschritt in relativ kurzer Zeit durchgeführt werden.

Die Wiederauffindung der C_{21}-Steroide Cortisol, Tetrahydrocortisol, Dihydrocortisol, Aldosteron, Cortison, Corticosteron, 11-Desoxycortisol, Tetrahydro-11-Desoxycortisol und 11-Desoxycorticosteron ist nach dem von uns modifizierten Verfahren der Girardtrennung mit durchschnittlich 74 % insgesamt für klinische Belange als ausreichend anzusehen.

Nachdem die Modifikation der Girardtrennung für C_{19}-Steroide hier nicht in Frage kam, haben wir zunächst versucht, eine Girardtrennung ohne Erhitzung, wie von Lindner vorgeschlagen, durchzuführen. Dabei hat sich aber ergeben, daß dieses Verfahren sich für Harnextrakte nicht eignet, lediglich für Versuche mit reinen Substanzen. Nach Anwendung bei C_{21}-Harnextrakten ergab sich eine erhebliche Emulsionsbildung, die so stark war, daß man durch Zentrifugieren keine Klärung erreichen konnte. Außerdem fiel bei Verwendung reiner Steroide auf, daß wir mit der Methode nach Lindner die dort beschriebene günstige Ausbeute innerhalb der einzelnen Fraktionen bzw. die Größe der Anteile nicht in vollem Umfange bestätigen konnten. Wir fanden lediglich in Ketofraktion A 27,3 % Cortisol, 12,69 % Cortison und 33,15 % Corticosteron, während Lindner hier 86 bis 95 % nachweisen kann. In Ketofraktion B beträgt der Prozentsatz für die genannten Steroide in gleicher Reihenfolge 2,29 %, 0,0 und 16,47 %, bei Lindner 0 bis 7 %. In der Nichtketofraktion (I) konnten wir etwas größere Mengen als Lindner finden, allerdings liegen diese Unterschiede noch im methodischen Schwankungsbereich. Tetrahydrocortisol ließ sich lediglich mit 64,7 %, also einem geringeren Betrag als bei Lindner, in der Nichtketofraktion nachweisen.

Vergleichen wir die bisher vorliegenden Daten der Harncorticoidbestimmung nach Anwendung der Blautetrazol-Reaktion mit unserem Durchschnittswert von 1,43 mg/24 Std., so finden wir sowohl bei Teller u. Staib (78), als auch bei Jensen (33) mit durchschnittlich 5,9 mg bzw. 4,2 mg/24 Std. höhere Werte. Der Grund hierfür kann darin zu sehen sein, daß bei einer sonst im wesentlichen ähnlichen Aufbereitung des Urins von den genannten Autoren keine weiteren Reinigungsschritte durchgeführt wurden, so daß der Ausfall der Farbreaktion, die durch unspezifische Begleitstoffe erheblich verändert werden kann (s.a. Marks et al.), dadurch beeinträchtigt wurde. Andererseits kann aus den bisherigen Werten, die im Rahmen der Erprobung der Methode anfielen, noch keine zu Vergleichszwecken notwendige Schwankungsbreite berechnet werden. Das Gleiche gilt für die Werte der C_{21}-Steroide, gemessen als Porter-Silber Chromogene. Hierbei handelt es sich ja im wesentlichen um Routineverfahren, bei denen keine weiteren Reinigungsschritte durchgeführt wurden, außer dem üblichen Auswaschen mit verdünnter Natronlauge nach der Extraktion.

Bei der anschließend an die Gruppenbestimmung der C_{21}-Steroide statt-

findenden analytischen Papierchromatographie absteigend im System Benzol-Chloroform (1:1)/Formamid-Aceton (3:7) findet man eine Sequenz der blau angefärbten Banden, die derjenigen bei der üblichen Verwendung von Benzol als absteigende Phase entspricht (Zaffaroni et al. (1950, 87), Burton et als. (1951, 5), Romanoff et al. (64), Pechet (55), Cox (11), Mattox et al. (1958, 47). Wir haben uns für das Lösungsmittelgemisch Benzol-Chloroform als absteigende Phase deswegen entschieden, weil damit eine befriedigendere Fraktionierung der im Urin vorliegenden Cortine nebst Tetrahydro- und Dihydroderivaten gelingt. Ein besonderer Vorteil ist die einwandfreie Trennung von Aldosteron und Cortison. Ein weiterer Vorteil ist, daß nach der beschriebenen Vorreinigung eine zusätzliche Chromatographie, wie sie allgemein in drei bis vier Systemen üblich ist, (Dyrenfurth et al. 13, Staub et al. 76) nicht erforderlich erscheint. Die Wiederauffindung von vor der Extraktion zugesetztem Aldosteron und Tritium markiertem Cortisol liegt zwischen 70 und 80 %. Hiernach findet während des Arbeitsganges ein relativ geringer Verlust statt. Ein Nachteil der analytischen Chromatographie ist ohne Zweifel die Überlagerung von Cortisol durch Tetrahydrocortison und von 11-Desoxcortisol durch Corticosteron. Will man in diesen beiden Fällen die einzelnen Komponenten genau bestimmen, so muß man im ersten Eluat eine UV-Bestimmung von Cortisol durchführen, im zweiten eine Bestimmung des Porter-Silber-Chromogens von 11-Desoxycortisol. In anderen Lösungsmittelsystemen, in denen man diese Überlagerung vermeiden kann, kommt es an anderen Stellen des Chromatogrammes nicht zu einer derartigen befriedigenden Trennung der Komponenten. Da die Banden am Ende des Streifens weniger intensiv gefärbt sind als am Anfang, entwickeln wir, wenn es die Steroidmenge zuläßt, zwei Streifen von jedem Extrakt, einen mit geringerer Substanzmenge beschickten für die Analyse der polaren Banden, einen zweiten, etwa zwei Drittel der Substanzmenge entsprechend, für die Gesamtauswertung. Die Auswertung mit Extinktionsschreibung ist an Genauigkeit sicherlich der im allgemeinen geübten Elution der Steroide vom Streifen mit nachfolgender Mengenbestimmung, sofern man ein hinreichend empfindliches Registriergerät benutzt, mit Ausnahme der Tracer-Analyse, überlegen.

Bei einem Vergleich der individuellen C_{21}-Steroide mit den vorliegenden Literaturergebnissen zeigt sich folgendes: Tetrahydrocortisol konnten de Courcy et al. (9) mit 212 µg/24 Std. nachweisen, wir fanden durchschnittlich 275 µg/24 Std. Romanoff (64) und Karl u. Raith (36) konnten mit 1,3 bzw. 1,51 mg/24 Std. etwas höhere Werte feststellen, die damit in der Größenordnung der Ausscheidung von Tetrahydrocortison lagen. De Courcy et al. konnten hier 1,5 mg/24 Std. feststellen, Karl u. Raith 2,73 mg/24 Std. und Romanoff sogar 3,81 mg/24 Std. Für Cortison konnten wir

im Durchschnitt 50 µg/24 Std. finden, entsprechend den Daten Zaffaronis (20 - 40 µg).

Der von uns gefundene Mittelwert von 27 µg/24 Std. für Aldosteron erscheint im Vergleich mit den anderen Autoren (51, 72, 14, 76), mit Ausnahme von Sobel et al. etwas hoch. Wir möchten die größere Ausbeute auf die vorausgehende Glucuronidase-Extraktion und auf die kontinuierliche Extraktion mit Methylenchlorid während 48 Stunden zurückführen (s.a. Sobel).

Die übrigen eindeutig identifizierten C_{21}-Steroide wurden zum Teil von Albeaux-Fernet (1) summarisch als Corticosteronkataboliten mit 0,6 bzw. 0,4 mg/24 Std. erfaßt. Wir finden für Tetrahydrocorticosteron, Tetrahydro-11-Desoxycortisol, Corticosteron und 11-Desoxycortisol zusammen 0,322 mg/24 Std., also einen etwas geringeren Betrag.

Nach peroraler Verabfolgung von Cortisol zeigt sich hauptsächlich eine vermehrte Ausscheidung von Tetrahydrocortisol wie bei Richardson et al. (61), desgleichen nach Verabreichung von 11-Desoxycortisol eine vermehrte Ausscheidung von Tetrahydro-11-Desoxycortisol. Nach Gabe von Aldosteron ist die Ausscheidung von Tetrahydroaldosteron vermehrt, ein Befund, der bisher deswegen nicht erhoben werden konnte, weil die übliche Aufbereitung des Urins für die Erfassung des Tetrahydroderivates von Aldosteron nicht geeignet war. Nur nach fermentativer Hydrolyse mit β-Glucuronidase, wie in dem von uns beschriebenen Verfahren, kann das Tetrahydroderivat erfaßt werden, während die bisher gängige Methode der pH 1-Hydrolyse lediglich das 3-Oxo-Konjugat aufschließt. So wird z.B. in Zukunft eine Untersuchung in Richtung eines Conn-Syndroms ohne vorausgegangene β-Glucuronidase Hydrolyse undenkbar sein, da in diesen Fällen besonders die Tetrahydrofraktion vermehrt ist und die Menge des aufgefundenen 3-Oxo-Derivates allein für die Diagnosestellung nicht ausreicht.

Die Verminderung der Corticoidausscheidung nach Cortison, Prednison und Dexamethason als Hypophysenbremse mit nachfolgender Abnahme der Nebennierenrindensekretion und Verminderung der Ausscheidung entsprechender Metaboliten ist aus der Literatur bekannt (Sprague et al. (1950, 73), Mc Intosh u. Holmes (1951, 44), Birke et al. (1954, 4), Pond (1955, 57), Stancakova u. Schweitzer (1962, 75).

Andererseits kommt es nach Metopiron zu einer vermehrten Ausscheidung der C_{21}-Steroide (s.a. Cleveland et al., 7). Diese vermehrte Ausscheidung geht auf eine Behinderung der 11-Hydroxylierung am Steroidmolekül bei der Bildung der Nebennierenrindenhormone durch Metopiron zurück (Coppage et al. (8), Jailer et al. (32), Horwitt et al. (30)). Cortisol kann nicht in dem üblichen Maßge gebildet werden, ein Rückkoppelungseffekt entfällt, es kommt zu einer vermehrten ACTH-Produktion der Hypophyse und danach zu

einer vermehrten Ausschüttung der auf dem Syntheseweg in der Nebennierenrinde vor Cortisol liegenden Substanz-S (Reichstein). Demzufolge geht die Vermehrung der C_{21}-Steroidausscheidung im wesentlichen auf Kosten von dessen Tetrahydroderivat. Von besonderem Interesse ist, daß Prednison 24 Tage lang in einer Dosis von 7,5 mg gegeben, noch nicht ausreicht, um eine Bremswirkung auf die Hypophysen-ACTH-Sekretion auszuüben. Der Metopironeffekt ist ohne Einschränkung zu beobachten.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde eine Methode zur papierchromatischen Trennung und quantitativ-kolorimetrischen Bestimmung der Cortine und Corticoide im Urin beschrieben.
2. Nach Hydrolyse und kontinuierlicher Extraktion wurde der Harnextrakt mit einer Modifikation der Girardtrennung und Eluierung der bei der Girardtrennung erhaltenen Fraktionen mittels einer Dextrangel-Säule vorgereinigt.
3. Nach Gruppenbestimmung der C_{21}-Steroide erfolgte die papierchromatographische Auftrennung in ihre einzelnen Komponenten im System Aceton-Formamid/Benzol-Chloroform. Es gelang eine befriedigende Trennung für Tetrahydrocortisol, Tetrahydroaldosteron, Aldosteron, Cortison, Tetrahydrocorticosteron und Tetrahydro-11-Desoxycortisol. Cortisol und Tetrahydrocortison sowie Corticosteron und 11-Desoxycortisol zeigen in diesem System keine eindeutige Trennung. Eine quantitative Bestimmung der Anteile kann nach Elution und nachfolgender UV-Absorption bzw. Porter-Silber-Reaktion an Hand entsprechender Standards erfolgen. Die quantitativ-kolorimetrische Auswertung aller übrigen mit Blautetrazol-Piperonyl gefärbten Banden fand mit dem Extinktionsschreiber statt.
4. Die Untersuchungsergebnisse bei innersekretorisch Gesunden, Patienten mit Herzinsuffizienz, nach Gabe von Prednison, Dexamethason, Metopiron und nach peroraler Verabreichung von Cortisol, Aldosteron sowie 11-Desoxycortisol wurden diskutiert.

F. LITERATUR

1. Albeaux-Fernet M., Burgard P., Romani J.D.; J. Clinic. Endocrin. a. Metabol. 17, 519, (1957): Excretion of urinary corticoids in condition of chronic asthenia.

2. Bagget B., Glick J.H. jr., Kinsella R.A. jr.; J. Clinic. Investig. 31, 615, (1952): Urinary excretion of Tetrahydrocortisone.

3. Beling C.G ; Natur 192, 326, (1961): Purification urinary conjugated oestrogens by gel filtration.

4. Birke G., Franksson C., Plantin L.O.; Acta Endocrinol. Suppl. 17, 29, (1954): On The excretion of androgens in carcinoma of the prostate: III. Cortisone therapy before and after orchiectomy.

5. Burton R.B., Zaffaroni A., Keutmann C.H.; J. Biol. Chem. 188, 763, (1951): Paperchromatography of steroids. II. Corticosteroids a. related compounds.

6. Bush I.E.; Biochem. Journ. 50, 370, (1952): Methods of paperchrom. of steroids in mammalian blood a. tissues.

7. Cleveland W.W., Nikezic M., Migeon C.J.; J. Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 22, 281 (1962): Response to an 11β-hydroxylase inhibitor (SU-4885) in males with adrenal hyperplasia a. in their parents.

8. Coppage W.S., Island D., Smith M., Liddle G.W.; J. Clinic. Investig. 38, 2101, (1959): Inhibition of aldosterone secretion a. modification of electrolyte excretion in man by a chem. inhibitor of 11β-hydroxylation.

9. de Courcy C., Bush I.E., Gray C.H., Lunnon J.B.; J. of Endocrinol. 9, 401 (1953): A chromatographic of investigation Δ -3-keto-steroids and α-ketolic steroids in human urine.

10. de Courcy C., Gray C.H.; J. of Endocrinol. 9, 391, (1953): Studies on the determination of urinary corticosteroids.

11. Cox R.J.; Nature 181, 638 (1958): Separation, detection and estimation of C_{21}, 17:20-dihydroxy20-methyl steroids.

12. Dobriner K., Lieberman S., Rhoada C.P.; J. Biol. Chem. 172, 241, (1948): Methods for the isolation and quantitative estimation of neutral steroids present in human urine.

13. Dyrenfurth I., Sybulski S., Notchev V., Beck J.C., Vennig E.H.; J. Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 38, 391, (1958): Urinary corticoid excretion patterns in patients with adrenocortical dysfunction.

14. Dyrenfurth I., Vennig E.H.; Endocrinol. 64, 648, (1959): Studies on the assay of aldosterone. Chromatography and chemical determination.

15. Flood C., Layne D.S., Ramcharan S., Rossipal E., Tait J.F., Tait S.A.S.; Acta Endocrinol. 36, 237, (1961): An investigation of the urinary metabolites and secretion rates of aldosterone and cortisol in man and a description of methods for their measurement.

16. Frantz A.G., Katz F.H., Jailer J.W.; J. Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 21, 1290, (1961): 6β-hydroxycortisol and other polar corticosteroids. Measurement and significance in human urtine.

17. Freislederer W., Butenandt I., Brüning I., Wiedmaier G.; Klin. Wochenschr. 817, (1959): Über die Ausscheidung der C_{17}-ketogenen Steroide im Urin gesunder Kinder. Ein Beitrag zur Brauchbarkeit verschiedener Modifikationen der Zimmermannschen Reaktion.

18. Gallagher T.F., Bradlow H.L., Miller D.G., Zumoff B., Hellman L.; J. of Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 22, 1049, (1962): Steroid hormone metabolism in chronic lymphatic leukemia.

19. Girard A., Sandulesco G.; Helvet. Chim. Acta 19, 1095, (1936): Sur une nouvelle serie de réactifs du groupe carbonyle, leur utilisation à l'extraction des substances cétoniques à la characterisation microchimique des aldehydes et cétones.

20. Göbel P., Heni F. d'Addabio A.; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. Physiol. Chemie 311, 201, (1958): Eine Methode zur papierchromat. Trennung und quantitativ-kolorimetrischen Bestimmung der 17 KS im Urin.

21. Göbel P., Heni F., Ulrich L.; Endokrinol. 37, 65, (1959): Über die Schwefelsäure-Alkohol-Reaktion von Dehydroepiandrosteron und ihre klinische Bedeutung.

22. Göbel P., bisher unveröffentlicht.

23. Gold N.I., Singleton E., Macfarlane D.A., Moore F.D.; J. Clinic. Investig. 37, 813, (1958): Quantitative determination of the urinary cortisol metabolites H_4F, aldosterone, H_4E: effects of ACTH and complex trauma in human.

24. Gold N.I.; Metabolism 8, 878, (1959 : Intermediary metabolism of cortisol.

25. Gray C.H., Lunnon J.B., Pond M.H., Simpson S.L.; J. Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 16, 473, (1956): Steroid studies in normal and adipose children.

26. Heftmann E., Johnson D.F.; Analyt. Chem. 26, 519, (1954): Determination of adrenocortical steroids in mixtures.

27. Heni F., Göbel P.; Endokrinol. 37, 230, (1959): Familiärer postpubertaler Hirsutismus.

28. Heni F., Göbel P.; Dtsch. Ges. in. Med. 166, (1959): Der Wert der papierchromatischen Trennung der 17-KS im Urin für die Differentialdiagnose der Überfunktion der NNR.

29. Hoffmann H., Staudinger H.J.; Biochem. Zeitschr. 322, 230, (1951): Papierchromatographische Trennung und Bestimmung der NNR-Hormone.

30. Horwitt B.N., Sobel C., Golub O.J.; Nature 189, 1006, (1961): Evaluation of the activity of corticosteroid 11β-hydroxylase.

31. Hurlock B., Talalay P.; Endocrinol. 62, 201, (1958): Enzymatic estimation of steroids in human urine.

32. Jailer J.W., Holub D.A., Frantz A.G.; Proc. of the Soc. f. experim. Biol. a. Medic. 104, 243, (1960): Cushing's syndrome. V. Chemical inhibition of 11β-hydroxylating enzyme systems in hyperplastic and neoplastic adrenal glands.

33. Jensen C.C.; Acta Endocrinol. 30, 222, (1959): Quantitative determination of some Tetrazolium salt reducing adrenocortic. in human urine.

34. Johnson D.F., Heftmann E., Hayden A.L.; Acta Endocrinol. 23, 341, (1956): Determination of individual adrenocortical steroids in urine.

35. Jones K.M., Lloyel-Jones R., Riondel A., Tait J.F., Tait S.A.S., Bubrock R.D., Greenwood F.C.; Acta Endocrinol. 30, 321, (1959): Aldosterone secretion and metabolism in normal men and women and in pregnancy.

36. Karl H.J., Raith L.; Klin. Wochenschr. 702, (1961): Cortisolsekretion und Cortisolabbau im Urin bei Fettsüchtigen im Vergleich zu Normalpersonen.

37. Katzenellenbogen E.R., Dobriner K., Kritchevsky T.H.; J. Biol. Chem. 207, 315, (1954): Separation of steroid hormones and their metabolites by partition type chromatography.

38. Kliman B., Peterson E.R.; J. Biol. Chem. 235, 1639, (1960): Double isotope derivative assay of aldosterone in biological extracts.

39. Layne D.S., Meyer C.J., Vaishwanar P.S., Pincus G.; J. Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 22, 107, (1962): The secretion and metabolism of cortisol and aldosterone in normal and in steroid treated women.

40. Lindner H.R.; Biochem. et Biophys. Acta 38, 360, (1960): Differences between oxosteroids in their behaviour towards the Girard-Reagent.

41. Löwenstein B.E., Corcoran A.C., Page I.H.; Endocrinol. (Springf. I, 11) 39, 82, (1946): nach: Chemische Bestimmungsmethoden von Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten von W. Zimmermann, 1955, Springer-Verlag.

42. Mac Donald P.C., Vande Wiele R.L., Lieberman S.; J. of Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 22, 1222, (1962): Precursors of the urinary 11-desoxy-17-ketosteroids: Influence of the level of secretion of dehydroisoandrosterone upon its metabolism.

43. Mac Donald P.C., Vande Wiele R.L., Liebermann S.; J. of Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 22, 1229, (1962): Influence of daily variation in the metabolism of dehydroandrosterone upon the determination of its secretory rate.

44. Mc Intosh H.W., Holmes C.B.; Lancet 261, 1061, (1951): Some evidence suggesting the supression of adrenocortical function by cortisone.

45. Mader W.J., Buck R.R.; Analyt. Chem. 24, 666, (1952): Colorimetric determination of cortisone and related ketol-steroids.

46. Marks L.J., Leftin J.H., Leonard M.P.; J. of Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 17, 407, (1957): Urinary PS-chromogens versus BT-chromogens as a quantitative index of adrenocortical function.

47. Mattox V.R., Lewbart M.L.; Arch. of Biochem. a. Biophys. 76, 362, (1958): New Zaffaroni type solvent system for chromatography of relative polar steroids.

48. Mills J.N.; Brit. Medic. Bull. 18, 170, (1962): Aldosterone secretion in man.

49. Moxham A., Nabarro D.N.; J. Clin. Path. 9, 351, (1956): Urinary glucocorticoid excretion.

50. Neher R., Wettstein A.; Acta Endocrinol. 18, 386, (1955): Physiochemical detection and measurement of aldosterone in body fluids and tissues.

51. Neher R., Wettstein A.; J. Clin. Investig. 35, 800, (1956): Physiochemical estimation of aldosterone in urine.

52. Norymberski J.K., Stubbs R.D., West H.F.; Lancet 264, 1276, (1953): Assessment of adrenocortical activity by assay of 17-ketogenic steroids in urine.

53. Örtel G.; Acta Endocrinol. 16, 267, (1954): Bestimmung von Corticoiden auf Papierchromatogrammen.

54. Patterson J.Y.F., Marrian G.F.; Acta Endocrinol. Copenh. 14, 259, (1953): Urinary adrenocortical steroids:III. Formaldehydogenic substances labile in acid solution at room temperature.

55. Pechet M.M.; Science 121, 39, (1955): Method for the chromatographic separation of very polar steroids.

56. Pincus G., Pearlman W.H.; Endocrinol. 29, 413, (1941): Fractionation of neutral urinary steroids.

57. Pond M.H.; Acta Endocrinol. 19, 1, (1955): The effect of corticotrophin and cortisone on neutral 17-ketosteroid metabolism as demonstrated by microchromatographic fractionation of urinary extracts from twelfe treated patients.

58. Porter C.C., Silber R.H.; J. Biol. Chem. 185, 201, (1950): A quantitative color reaction for cortisone and related 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids.

59. Reddy W.J.; Metabolism 3, 489, (1954): Modification of the Reddy-Jenkins-Thorn method for the estimation of 17-OH corticosteroids in urine.

60. Reichstein T.; Helvet. Chim. Acta 19, 1107, (1936): Über Bestandteile der NNR. Trennungsmethode, Isolierung der Substanzen F a., H und J.

61. Richardson E.M., Touchstone J.C., Dohan C., Buschalenko H., Landolt J., Applin W.; J. of Clinic. Investig. 34, 285, (1955): Urinary α-ketolicsteroid metabolites of cortical hormones administered to subjects with adrenal cortical insufficience.

62. Rivoire R., Rivoire J., Poujol J.; J. Biol. Chem. 213, 11, (1955): The determination of urinary 7-trioxysteroids.

63. Romani J.D.; La Semaine d. Hôpit. d. Paris 31^{e} année, Nr. 60, (1955): Une methode de dosage des glycorticoides dans les urines. Technique et résult.

64. Romanoff L.P., Rodriguez R.M., Seelyle J.M., Parent C., Pincus G.; J. of Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 18, 777, (1957): Determination of H_4F a. H_4E in the urine of normal and schizophrenic men.

65. Samuels L.T.; Cancer 10, 746, (1957): Factors affecting the metabolism and distribution of cortisol as measured by levels of 17-hydroxycorticosteroids in blood.

66. Sandberg A., Nelson D.H., Glenn E.M., Tyler F.H., Samuels L.T.; J. of Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 13, 1445, (1953): 17-hydroxycorticosteroids and 17-ketosteroids in urine of human subjects:clinical application of a method employing β-glucouronidase hydrolysis.

67. Schmidt H., Staudinger H.J., Bauer V.; Biochem. Zeitschrf. 324, 128, (1953): Eine weitere Vereinfachung und Verbesserung der papierchromatographischen Corticoidbestimmung.

68. Siegenthaler W.E., Dowdy A., Luetscher J.A.; J. of Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 22, 172, (1962): Determination of the secretion rate of aldosterone in normal man by use of 7-H^3-d-aldosterone in acid hydrolysis of urine.

69. Silber R.H., Porter C.C.; J. Biol. Chem. 210, 923, (1954): The determination of 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids in urine and plasma.

70. Simpson S.A., Tait J.F., Wettstein A., Neher R., v. Euw J., Schindler O., Reichstein T.; Experientia 9, 333, (1953): Isolierung eines neuen kristallisierten Hormons aus Nebennieren mit besonders hoher Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel.

71. Simpson S.A., Tait J.F., Wettstein A., Neher R., v. Euw J., Schindler, O., Reichstein T.; Helvet. Chim. Acta 37, 1163, (1954): Aldosteron, Isolierung und Eigenschaften. Über Bestandteile der NNR und verwandter Stoffe.

72. Sobel C., Henry R.J., Golub O.J., Rudy M.; J. of Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 19, 1302, (1959): Chemical determination of aldosterone in urine.

73. Sprague R.G., Power M.H., Mason H.L., Albert A., Mathieson D.R., Hench P.S., Kendale E.C., Slocumb C.H., Polley H.F.; Arch. int. Med. 85, 199 (1950):Observations on the physiologic effects of cortisone and ACTH in man.

74. Sprechler M.; Acta Endocrinol. Copenh. 4, 205, (1950): Investigation on the chemical determination of corticoids in urine.

75. Stancakova A., Schweitzer P.; Endokrinol. 42, 55, (1962): Einfluß exogen verabreichter Corticosteroide auf die Ausscheidung der Harncorticosteroide. Prednisoneffekt.

76. Staub M.C., Dingman J.F., Fesler K.W.; J. of Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 21, 148, (1961): Rapid method for determination of aldosterone in human urine by glass paper chromatography.

77. Talbot N.B., Buttler A.M., Mc Lachlan E.A., Johnes R.N.; J. Biol. Chem. 136, 365, (1940): Definition and elimination of certain errors in the hydrolysis, extraction and spectrochemical assay of α- and β-neutral urinary 17-ketosteroids.

78. Teller W., Staib W.; Acta Endocrinol. 28, 447, (1958): A contribution to the determination of reducing corticosteroids in urine.

79. Teller W., Staib W.; Acta Endocrinol. 32, 209, (1959): Studies on the "differential" hydrolysis of steroid conjugates in urine.

80. Ulstrom R.A., Colle E., Burley J., Gunville R.; J. of Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 20, 1080, (1960): Adrenocortical steroid metabolism in newborn infants. II. Urinary excretion of 6β-hydroxycortisol and other polar metabolites.

81. Vande Wiele R.L., Mac Donald P.C., Bolte E., Lieberman S.; J. of Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 22, 1207, (1962): Precursors of the urinary 11-desoxy-17-ketosteroids. Estimation of the secretory rate of dehydroisoandrosterone.

82. Vennig E.H., Dyrenfurth I., Kazmin V.E.; Recent progress in hormone research 8, 27, (1953): Hydrolysis and extraction of corticoids and 17-KS from body fluids.

83. Vermeulen A.; Les Annales d'Endocrinol. 18, 808, (1957): Confrontation des résultats du dosage des 17-hydroxycorticoides avec les données de la chromatographie sur papier.

84. Vestergaard P.; Acta Endocrinol. 13, 241, (1953): Investigation on the estimation of 17-OH corticoids in the urine using PS-reaction.

85. Wilson H., Borris J.J., Garrison M.M.; J. of Clinic. Endocrinol. a. Metabol. 18, 643, (1958): Chromatographic procedure for the determination of urinary corticosteroids and C_{19}-steroids.

86. Zaffaroni A., Burton R.B., Keutmann E.H.; J. Biol. Chem. 177, 109, (1949): The application of paper partition chromatography on steroid analysis.

87. Zaffaroni A., Burton R.B., Keutmann E.H.; Science 111, 6, (1950): Adrenal cortical hormones: analysis by paper partition chromatography and occurence in the urine of normal persons.

88. Zimmermann W.; Zeitschrf. f. physiol. Chemie 233, 257, (1935): Eine Farbreaktion der Sexualhormone und ihre Anwendung zur quantitativen colorimetrischen Bestimmung.

Für die Überlassung des Themas möchte ich Herrn Professor Dr. F. Heni meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Dr. med. P. Göbel danke ich ebenfalls für seine hilfsbereite Unterstützung und Beratung bei der Ausführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 22. 12. 1938 wurde ich als Tochter des Hauptlehrers Eugen Bizenberger und seiner Ehefrau Margarete geb. Munz, in Erlenbach, Kreis Neckarsulm, geboren. 1942 ist mein Vater in Rußland gefallen.
Das Abitur absolierte ich 1958 an dem neusprachlichen Droste-Hülshoff-Gymnasium in Rottweil. Mein Medizinstudium begann ich im Sommersemester 1958 an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen, wo ich im April 1959 die naturwissenschaftliche und im Oktober 1960 die ärztliche Vorprüfung bestand. Im siebten Fachsemester studierte ich in Wien, im achten an der Medizinischen Akademie in Düsseldorf und kehrte im neunten Semester wieder an die Universität Tübingen zurück. Hier legte ich am 29. 6. 1964 das medizinische Staatsexamen ab.